

003770968

WPI Acc No: 1983-767184/198338

Anticancer drug - comprising ribosome modified with mono-clonal antibody

Patent Assignee: HASHIMOTO Y (HASH-I)

Number of Countries: 001 Number of Patents: 002

Patent Family:

Patent No	Kind	Date	Applicat No	Kind	Date	Week
JP 58134032	A	19830810				198338 B
JP 91055450	B	19910823	JP 8215574	A	19820204	199138

Priority Applications (No Type Date): JP 8215574 A 19820204

Patent Details:

Patent No	Kind	Lan	Pg	Main IPC	Filing Notes
JP 58134032	A		3		

Abstract (Basic): JP 58134032 A

A ribosome modified with a monoclonal antibody forms an anticancer material in particle and/or membrane form. The ribosome exerts specifically for cancer tissue and the anticancer material is transferred into cancer cells. Therefore, the anticancer drug containing the ribosome has little in the way of side effects.

The anticancer material is mixed into a soln. of the constituent lipid of the ribosome and a monolayer ribosome is formed by ultrasonic treatment etc. in a conventional manner. Thereby, fat-soluble anticancer material is uniformly dispersed into a membrane and water-soluble anticancer material is enclosed in lipid vesicle, and therefore the ribosome is present in the form of microcapsule. To introduce the monoclonal antibody into the membrane, an antibody fragment carrying SH-gps. is used. For IgM, IgM antibody is treated with e.g. cysteine to reduce only J-chain and IgM subunit (IgMs) having two mercapto gps. is prepd. Ribosome having many maleimide gps. originating from m-maleimidebenzoyl -N-(dipalmitoylphosphatidyl) ethanolamine on its membrane is used. IgMs is added to the soln. of the ribosome in PBS and incubated at 37 deg.C for about 1 hr. to cause

SH-addn. reaction.

Derwent Class: B04

International Patent Class (Additional.): A61K-009/10; A61K-031/71;

A61K-037/02; A61K-039/44

⑩ 日本国特許庁 (JP)

⑪ 特許出願公開

⑫ 公開特許公報 (A)

昭58-134032

⑬ Int. Cl.<sup>3</sup>  
A 61 K 39/44  
9/10  
9/56  
31/71

識別記号  
ADU

庁内整理番号  
6408-4C  
7057-4C  
7057-4C  
6675-4C

⑭ 公開 昭和58年(1983)8月10日

発明の数 1  
審査請求 未請求

(全 3 頁)

⑮ 制癌性製剤

仙台市三神峯1丁目3-3-50  
6

⑯ 特 願 昭57-15574

⑰ 出 願 人 橋本嘉幸

⑱ 出 願 昭57(1982)2月4日

仙台市三神峯1丁目3-3-50  
6

特許法第30条第1項適用 昭和57年2月1日

発行の「読賣新聞」14版第3頁に掲載

⑲ 代 理 人 安藤憲章

⑳ 発 明 者 橋本嘉幸

明 細 書

1. 発明の名称

制癌性製剤

2. 特許請求の範囲

粒子内及び／又は膜中に制癌性物質を含有させたモノクローナル抗体修飾リボソーム。

3. 発明の詳細な説明

本発明は新しい形態の制癌性製剤に関する。

更に詳しくは、制癌性物質を癌組織に選択的に送達し、所々にける薬物濃度を高く保つべく、膜上に癌に対する抗体を結合せしめたリボソームを用いた制癌性製剤である。

現在市販されている制癌剤は主として癌細胞に対する細胞毒性物質からなる化学療法剤と担癌患者の免疫能を促進させることによる間接的制癌効果を有する免疫療法剤である。免疫療法においても制癌効果を高めるためには他の化学療法剤の併用が必要とされる。

しかしながら、化学療法剤は一般に癌細胞と正常細胞との間の選択性を有さず、激しい副作用の

発現が避けられない。

本発明者はこれらの事情に鑑み、化学療法剤の強い細胞毒性を癌細胞に選択的に発現させるべく研究の結果本発明をなすにいたった。

すなわち本発明は、粒子内及び／又は膜中に制癌性物質を含有させたモノクローナル抗体修飾リボソームである。

本発明を実施するに当り制癌性物質は、リボソームの構成脂質の溶液に混じ、寫法により超音波処理等の操作を加えて単層リボソームを形成させることにより脂溶性の制癌性物質は膜中に均一に分散し、水溶性の制癌性物質は脂質小腔内に包み込まれ、マイクロカプセル状に存在せしめることができる。

一方、膜上にモノクローナル抗体を結合せしめるためには、SH基をもった抗体フラグメントを調整し用いる。IgMの場合はIgM抗体を還元条件下で、例えばシステインで還元して、J鎖のみを還元し、メルカプト基2個を有するIgMサブユニット(IgM<sub>2</sub>)を調製する。IgG抗体の場合にはベ

ブシン誘化後メルカプトエタノールで還元し、メルカプト基1個を有するPab'分子を単離精製して用いる。

一方、リボソームを形成する際、構成成分の一であるアミノ基を有する脂質類、例えば、ジバシミトイルホスファチジルエタノールアミン(DPPBA)と $m$ -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシイミドエステルとの反応によって得られる $m$ -マレイミドベンゾイル-N-(ジバシミトイルホスファチジル)エタノールアミン(MBPBA)を他の脂質類例えばジミリスチルレシチン、ジバシミチルレシチン、ジステアロイルレシチン等のレシチン類、ホスファチジルイノシトール、ホスファチジルセリン、ホスファチジン酸及びコレステロール等の一種又は二種以上と適宜の比率で混合しクロロホルム等の脂溶性有機溶媒に溶解し、以下常法によりリボソームを形成させる。ここで得られたリボソームは膜上にMBPBA由来のマレイミド基が多数存在する。

このリボソームの培養液( PBS )液に

1)とをPBOを用いる常法により融合させて得られたハイブリドーマ2-11-GクローンをMEM-10%FOS培地20~25mlに $1 \times 10^6$ 個接種し、4~7日間、37℃、5%CO<sub>2</sub>インキュベーター中で培養した。

上清を集めて50%減塩析を2回行なつてからセファクリールS-300カラム(90×32cm)にかけ0.2Mトリス塩緩衝液(pH8.6)で洗出、精製したIgM画分を限外ろ過により濃縮した。

## 2) IgMの調整

1)により得られたIgMに最終濃度が0.05Mとなるようシステインを加えて、Miller & Metzgerの方法に準じて、24℃で8時間反応させ還元した後、セファロースOL6Bカラム(30×18cm)にかけ、2mmBEDTA含有PBS(pH7.0)を用いて洗出、精製した。

IgMからの収率は蛋白量として約50%であった。

先に調製したIgMを加えて37℃で約1時間インキュベートしてSH付加反応を行なわせ、未反応のマレイミド基の不活化のために少量のシステインを加える。

かくして、IgMは抗原認識に重要なPab部分に何ら影響を与えることなく、Fc部分でリボソームの膜上に複数個結合せしめることができる。

このようにして得られる、制癌性物質を含有し、癌抗原に対するモノクローナル抗体を膜上に有する本発明のリボソームは、癌組織に特異的に作用し、制癌性物質を癌細胞内に移入することができるので副作用の少ない制癌性薬剤として用いられる。

## 製造例

### 1) モノクローナル抗体の調製

MM-46細胞(03H系マウスに自然発生した乳癌細胞を凍水化したもの)で免疫され、細胞障害性抗体(抗体価1/640)を産生している(BALB/c×03H/Hc)F<sub>1</sub>マウスの脾細胞とB-アザグアニン耐性ミエロマ細胞NS-

### 3) MBPBAの合成

25μMの $m$ -マレイミドベンゾイル-N-ヒドロキシサクシイミドエステルとDPPBA20μMを5mlのクロロホルム-メタノール(9:1)に溶解し、トリエチルアミン30μMを加えて室温下攪拌する。反応終了後、反応液に3.5mlのメタノールついで2mlの水を加えて、下層のクロロホルム層を採り、これに少量のベンゼンを加えて溶媒を留去し、残液に2mlのクロロホルムを加えてユニシルカラムにかけて精製する。

得られたMBPBA 1M中には、還元剤の存在下モリブデン水溶液を青色化する比色定検により過酸イオン1Mを含み、また、チオール基(メルカプトエタノールを用いた)との反応性を利用したマレイミド基の定量試験で1Mのマレイミド基の存在が確認された。

### 4) リボソームの作成

ジバシミトイルレシチン	50μM
MBPBA	5μM
コレステロール	35μM

をクロロホルムに溶解し、これに更にアクテノマイシン D 500  $\mu$ g を加えて均一にしてから溶媒を除去し、これに10 ml のPBSを加えて室温で10分間攪拌した後充分冷しながら超音波処理を行ない、10,000 rpm で30分間冷却遠心して小粒径のリボソームを含む上清を得た。

5) 4) で得られた上清4 ml に2) で得られた IgM 面分2 ml を加えて37℃で1時間インキュベートし、次いで血清アルブミン等のSH基との反応を防止する為未反応のマレイミド基を5%のシステインを加えて、37℃で30分間インキュベートして不活化した。

次いで未封入のアクテノマイシン D 及び過剰のシステインを除く為濃度勾配(0~20%)デキストランを用いてリボソームを単離した。

#### 試験例〔制癌効果〕

O3H/Heマウス(雄, 6週令)腹腔に $5 \times 10^4$ 個のMM-46癌細胞を移植した。24時間後、アクテノマイシンDの含量を変化させて製造した本発明のリボソームを50  $\mu$ g 投与し制癌効果を調べた。

比較の為K、アクテノマイシンD単独(AD)、ADを含まない抗体結合リボソーム(2-11-Gs-Lip)、抗体を結合していないAD含有リボソーム(Lip-AD)、抗体の替りKB SAを結合したAD含有リボソーム(BSA-Lip-AD)をそれぞれ投与し、癌に対する影響を調べた結果は次のとおりである。

尚、比較用の各リボソームは前記製造例に準じて調製した。

表

投与物質 (AD含量)	治療数/ 実験マウス数	死亡マウスの 平均生存日数 (標準偏差)
-	0/6	21.7(1.4)
AD(1.25)	0/3	22.7(2.1)
2-11-Gs-Lip	0/3	21.3(2.7)
Lip-AD(1.0)	0/3	33.0(3.7)
BSA-Lip-AD(0.3)	0/3	23.7(1.7)
BSA-Lip-AD(1.0)	0/3	27.3(2.7)
2-11-Gs-Lip-AD(0.3)	*3/6	32.7(2.7)
2-11-Gs-Lip-AD(0.5)	*4/6	33.36
2-11-Gs-Lip-AD(1.0)	*6/6	—

\* 治療マウスはいずれも90日以上生存した。

表から明らかなように本発明のリボソームは優れた制癌効果を有する。

この例ではADの場合について示したが、他の化学療法剤も同様に通常の投与量よりもはるかに少ない量を含有せしめた本発明のリボソームによって著しい制癌効果をもたらすことができる。

特許出願人 橋本嘉幸

代理人 安藤寛重